

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARA CRISTINA BORSATTO

TERAPIA GÊNICA: SUCESSOS E INSUCESSOS

PARANAVÁI

2015

SARA CRISTINA BORSATTO

TERAPIA GÊNICA: SUCESSOS E INSUCESSOS

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do Curso de Especialização em Genética para Professores do Ensino Médio, na modalidade de Ensino a Distância, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.^a Dr^a. Karin Braun Prado

PARANAVÁÍ

2015

AGRADECIMENTOS

Á Deus por conceder-me a oportunidade de mais essa experiência. Obrigada por estar sempre ao meu lado nas perdas e nas quedas que o mundo nos proporciona, mas principalmente por me estender a mão para reerguer-me e força para continuar a luta em busca de conquistas e humildade nas vitórias.

Aos meus amorosos pais, Raul e Elóia, por acreditar no meu potencial e sempre incentivar na busca pelo conhecimento.

Aos meus irmãos, Nara e Marcelo, por todo amor e apoio que sempre me deram.

As minhas sobrinhas, Marcelly e Maysa, pelo amor genuíno.

Ao meu colega de trabalho Luciano Champam por ter me apresentado à oportunidade e incentivado a inscrever-me nessa pós-graduação, o meu muito obrigado.

A minha Orientadora Doutora Karin Braun Prado, por todas as orientações, paciência e dedicação com este trabalho, e principalmente pelas mensagens de motivação a cada e-mail enviado.

As minhas tutoras Marisa Inês Bilthauer, Josefina Aparecida Soares Guedes e Cintia Callegari Coelho por estar sempre prontas a ajudar.

A Coordenadora Doutora Nina Pagnan por não medir esforços para realização desse curso de pós graduação.

Enfim, a todos que não foram citados, mas que de alguma forma me ajudaram e me incentivaram durante esse período.

RESUMO

A terapia gênica é um procedimento destinado a introduzir em um organismo, com o uso de técnicas de DNA recombinante, genes terapêuticos para substituir, manipular ou suplementar genes inativos ou disfuncionais, baseando-se no entendimento de que algumas doenças são causadas por defeitos em um ou mais genes. O vetor faz a proteção e transporte do material genético a células alvo, e são em geral categorizados como vetores virais e vetores não virais. Os principais vetores virais são: adenovírus, vírus adenoassociado, retrovírus, lentivírus, e vírus do herpes simplex. Entre os Vetores não virais incluem-se plasmídeos, lipossomos, Lipídeos catiônicos e RNA interferente. Para introdução dos genes no organismo duas estratégias básicas são utilizadas: in-vivo e ex-vivo. O tratamento de doenças humanas através da transferência de genes foi originalmente direcionado para doenças hereditárias, entretanto, a maioria dos experimentos clínicos atualmente em curso esta direcionado para o tratamento de doenças adquiridas como AIDS, doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer. Para ilustrar as aplicações da terapia gênica serão abordadas doenças como, Hemofilia, Síndrome da Imunodeficiência Severa Combinada ligada ao X, Síndrome de Wiskott-Aldrich, Amaurose Congênita de Leber e Câncer. O balanço de efeitos adversos e benefícios em ensaios clínicos de terapia gênica indicam que o curso do desenvolvimento das terapias avançadas será tanto mais seguro quanto mais bem fundamentado pela pesquisa básica e sujeito a regulamentação adequada para restringir a autorização de ensaios clínicos à condição de máxima segurança possível na época dos ensaios. Falar em terapia gênica significava adentrar em um terreno de pura experimentação da medicina e já são colhidos os primeiros frutos das pesquisas, sinalizando que os pesquisadores já estão capacitados e já podem avançar, porém apesar do sucesso desses recursos, algumas ponderações são necessárias. Nesse trabalho serão abordadas as diversas formas de manipulação do gene e das metodologias usadas para inserção do mesmo no organismo.

Palavras-chave: Terapia Gênica 1. Vetores Virais 2. Vetores Não Virais 3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Construção de um vetor viral para terapia gênica.....	14
Figura 2 – Produção em massa de vetores virais para terapia gênica.....	15
Figura 3 – Retrovírus	16
Figura 4 – Adenovírus	17
Figura 5 – Uso de Adenovírus na Terapia Gênica.....	18
Figura 6 – Vírus Adeno-associado.....	18
Figura 7 – Plasmídeo	20
Figura 8 – Lipossomas	21
Figura 9 – Lipídeo catiônico (a) / Lipoplexo (b).....	22
Figura 10 – Ação de RNA interferência em células animais (A).....	24
Figura 10 – Ação de RNA interferência em células animais (B).....	24
Figura 11 – Estratégias de Terapia Gênica <i>ex- vivo</i> e <i>in-vivo</i>	25
Figura 12 – Mecanismo de ação de genes suicidas	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produtos de TG em estágio avançado de desenvolvimento.....	36
Tabela 2 – Seleção de Projetos Horizon 2020.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV – Vírus Adeno-associado
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EBV – Vírus Epstein-Barr
FIV – Vírus da imunodeficiência Felina
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV – Vírus Herpes Simples
Ig- Imunoglobulina (IgA/ IgE/ IgM)
IL – Interleucina
IMI – Medicamentos Inovadores
IRDIRC – Consórcio de Pesquisas de Doenças Raras internacionais
ITR- DNA das Regiões Terminais
LCA – Amaurose Congênita de Leber
MLV – Vírus da Leucemia Murina de Moloney
mRNA – RNA mensageiro
miRNA – Micro RNA
NK – Células Natural Killer
OTC – Ornitina Transcarbamilase
pDNA – Plasmídeos
PQ – Programas-quadro
rAAV – Vetor Derivado de Vírus Adenoásociado
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAi – RNA Interferente/Interferência
SCID-XL – Síndrome da Imunodeficiência Severa Combinada ligada ao X
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
shRNA - Short Hairpin RNA (grampos curtos de RNA)
siRNA - Small Interfering RNA (pequenos fragmentos de RNA)
SIV – Vírus da imunodeficiência Simi
TG – Terapia Gênica/ Terapia Genética
WAS – Síndrome Wiskott-Aldrich

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	JUSTIFICATIVA	9
3	OBJETIVOS	10
3.1	OBJETIVO GERAL.....	10
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4	METODOLOGIA	11
5	RESULTADOS	12
5.1	VETORES VIRAIS.....	13
5.1.1	Retrovírus	15
5.1.2	Lentivírus	16
5.1.3	Adenovírus	17
5.1.4	Vírus Adeno-associado	18
5.1.5	Vírus Herpes Simples	19
5.2	VETORES NÃO VIRAIS	19
5.2.1	Plasmídeos	20
5.2.2	Lipossomas	20
5.2.3	Lipídeos catiônicos	21
5.2.4	RNA Interferente	22
6	DISCUSSÃO	26
6.1	HEMOFILIA	26
6.2	SÍNDROME DA IMUNODEFICIENCIA SEVERA COMBINADA LIGADA AO X (SCIDX1).....	28
6.3	SÍNDROME WISKOTT-ALDRICH (WAS).....	29
6.4	AMAUROSE CONGÊNITA DE LEBER (<i>LEBER'S CONGENITAL AMAUROSIS - LCA</i>)	31
6.5	CÂNCER	32
6.6	RISCO-BENEFÍCIO NA TERAPIA GÊNICA.....	33
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A medicina Moderna acrescenta, a cada dia, descobertas importantes em áreas de investigação destinadas ao desenvolvimento de novos paradigmas de tratamento para doenças ainda incuráveis. Entre elas, a expectativa de curar doenças genéticas repousa sobre a identificação de genes responsáveis por sua patogênese e sobre avanços das tecnologias de DNA recombinante, ou “engenharia genética”, que permitam a manipulação do genoma de forma cada vez mais eficiente e segura (Watson et al, 2006).

Desde 1990 quando foi estabelecido nos Estados Unidos o primeiro protocolo de Terapia Gênica em Humanos, ocorreu o desenvolvimento de vários estudos com perspectivas de uso de genes. Muito também se deveu ao sucesso do tratamento com terapia gênica realizado nas crianças portadoras da Imunodeficiência Combinada Severa (MENCK & VENTURA, 2007). A terapia gênica (ou terapia genética) é um procedimento destinado a introduzir em um organismo, com o uso de técnicas de DNA recombinante, genes sadios (genes terapêuticos) para substituir, manipular ou suplementar genes inativos ou disfuncionais (LINDEN, 2008). A capacidade de interferir na constituição genética de um indivíduo, por meio da terapia gênica, surge então como uma alternativa para resolver problemas relacionados à saúde humana, pela cura de doenças genéticas herdadas dos pais, ou mesmo de doenças que podem ser adquiridas durante a vida, como o câncer, doenças do coração e infecções virais (MENCK & VENTURA, 2007).

Nesse trabalho serão abordadas as diversas formas de manipulação do gene e das metodologias usadas para inserção do mesmo no organismo.

2 JUSTIFICATIVA

A terapia gênica promete ser uma área fértil de pesquisa científica e clínica e não há dúvidas que se tornará uma prática clínica importante nesse novo século. A terapia gênica poderá representar a mudança de paradigma da medicina, com importantes repercussões na sociedade (DANI, 2000). Os avanços recentes estão fazendo renascer as perspectivas que eram esperadas anteriormente, mas os sucessos devem ser observados com otimismo cauteloso, e ainda requerem intenso trabalho de pesquisa (MENCK & VENTURA, 2007).

Ainda estamos no limiar da história da terapia gênica e tudo que se fez até hoje são os primeiros passos de uma longa e tortuosa caminhada (Flotte, 2007). O Brasil prepara-se para o advento da terapia gênica na prática médica. Mas a decisão de investir nessa área, tanto do ponto de vista financeiro quanto do ponto de vista científico e educacional, seguramente terá retorno significativo para a medicina brasileira do século XXI (LINDEN, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa à ampliação dos conhecimentos sobre terapia gênica, para que seja possível transmitir aos alunos do ensino médio, informações teóricas fundamentadas sobre o tema e de como esse pode ser aplicado em benefício do homem.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Definir o que é Terapia Gênica;
- b) Identificar e caracterizar os vetores utilizados na Terapia Gênica;
- c) Correlacionar os riscos e vantagens associados a cada vetor.

4 METODOLOGIA

Revisão bibliográfica da literatura nacional e internacional sobre Terapia Gênica e sobre os vetores utilizados. Para o levantamento bibliográfico foram empregadas as seguintes palavras chaves: terapia gênica, vetores virais e vetores não virais nos indexadores MEDLINE, Pubmed, LILACS, Scielo, BIREME e Google acadêmico, selecionando artigos científicos relevantes ao tema publicados entre janeiro de 2000 e abril de 2015.

5 RESULTADOS

Com o uso de técnicas de DNA recombinante, a terapia gênica é um procedimento destinado a introduzir em um organismo, sequências gênicas para substituir, manipular ou suplementar genes inativos ou disfuncionais (LINDEN, 2008). Em sua forma mais simples, a terapia gênica consiste na inserção de genes funcionais em células com genes defeituosos para substituir ou complementar esses genes causadores de doenças (DANI, 2000).

Seu princípio baseia-se no entendimento de que algumas doenças são causadas por defeitos em um ou mais genes, levando a produção descontrolada ou a supressão de uma proteína essencial para o funcionamento das células (ANDERSON, 2000). Com o mapeamento do genoma humano, aproximadamente 10.000 fenótipos variantes já são conhecidos, e a maioria destes são desencadeadores de doenças incuráveis. Com o advento de novas tecnologias, em particular na área da biologia molecular, a aplicação clínica da terapia gênica tem vindo a se tornar uma possibilidade real na cura dessas doenças (PENQUE, 2000).

O primeiro uso da terapia gênica (TG) em humanos foi iniciado, em 1990, numa garota com imunodeficiência letal, causada pela deficiência da adenosina desaminase, a qual recebeu uma transfusão de linfócitos geneticamente corrigidos e cuja expressão do transgene foi de longa duração (VASQUEZ E MEIRELLES, 2001).

Um dos pontos mais importantes para segurança e eficácia dessa terapia é a seleção do vetor, que faz a proteção e o transporte do material genético à célula alvo. Sem esse vetor, o gene é facilmente degradado por endonucleases (GINN et al, 2013). O vetor é um transportador que ajuda a contornar as barreiras naturais contra a internalização de DNA para o núcleo da célula, local no qual haverá a utilização da maquinaria celular para expressar o gene exógeno (WORGALL, 2005). Para ser considerado ideal, o vetor precisa apresentar algumas características como: capacidade de acomodação de um transgene de tamanho ilimitado, baixa imunogenicidade e citotoxicidade, expressão estável do transgene, direcionamento para tipos específicos de células ou tecidos, baixo custo, fácil produção e manipulação e ainda possibilidade de regular a expressão do gene exógeno no tempo e/ou na quantidade (NARDI et al, 2002). No entanto,

entre as alternativas disponíveis podemos escolher aquele que melhor se adapte as características terapêuticas desejadas no tratamento.

Em geral, os sistemas de vetores de transferência de genes podem ser categorizados em sistemas virais e não virais. Dada a ampla diversidade de órgãos e células-alvo potenciais para a terapia de genes, um único sistema de vetor é improvável que seja apropriado para todas as aplicações potenciais (WORGALL, 2005). Mais de 75% dos ensaios clínicos utilizaram vetores virais e somente em torno de 25% vetores não virais, sendo que 18% foram feitos com DNA livre e 6% com lipídios catiônicos (GINN et al, 2013). A segurança ainda é a principal barreira ao desenvolvimento da terapia gênica na prática médica. O principal entrave é o fato de que os vetores não virais mais seguros disponíveis são ainda pouco eficientes ou tem aplicação muito limitada, entretanto a alta eficiência de transdução de vetores virais é o que os torna os mais promissores para essa aplicação (WORGALL, 2005).

Entre os vetores empregados estão os vetores virais, classe em que estão inseridos adenovírus, lentivírus, retrovírus, e os não virais, que incluem métodos de transferência gênica realizada através de métodos químicos e físicos.

5.1 VETORES VIRAIS

Os vírus são microorganismos especializados em invadir células e nelas introduzir material genético. Contêm ácido nucleico (DNA ou RNA) cercado por uma capa de proteína e, em alguns casos de um envelope adicional de proteínas e lipídios e seu ciclo de vida implica liberação do ácido nucleico viral na célula hospedeira. Essa propriedade é explorada para introduzir genes terapêuticos nas células (Linden, 2010).

Os vetores virais são compostos por vírus geneticamente modificados em que há limitação do seu potencial de replicação, restringindo-o para apenas um ciclo de replicação apenas como medida de segurança (Park et al, 2013, Kolokoltsov et al, 2005). A remoção de genes virais que conferem o caráter patogênico e a multiplicação permite, por exemplo, que um vírus da mesma subfamília do patogênico vírus HIV possa dar origem a um vetor viral útil para terapia gênica (LINDEN, 2010).

Os principais grupos de sistemas de vetores de transferência de genes virais são derivados a partir de adenovírus, de vírus adeno-associado (AAV), retrovírus, lentivírus, e vírus do herpes simplex (HSV) (WORGALL, 2005), com características que lhes conferem vantagens ou desvantagens que dependem fundamentalmente da característica das doenças a serem tratadas (Park et al, 2013, Kolokoltsov et al, 2005)

As etapas para construção de um vetor viral são descritas nas figuras 1 e 2.

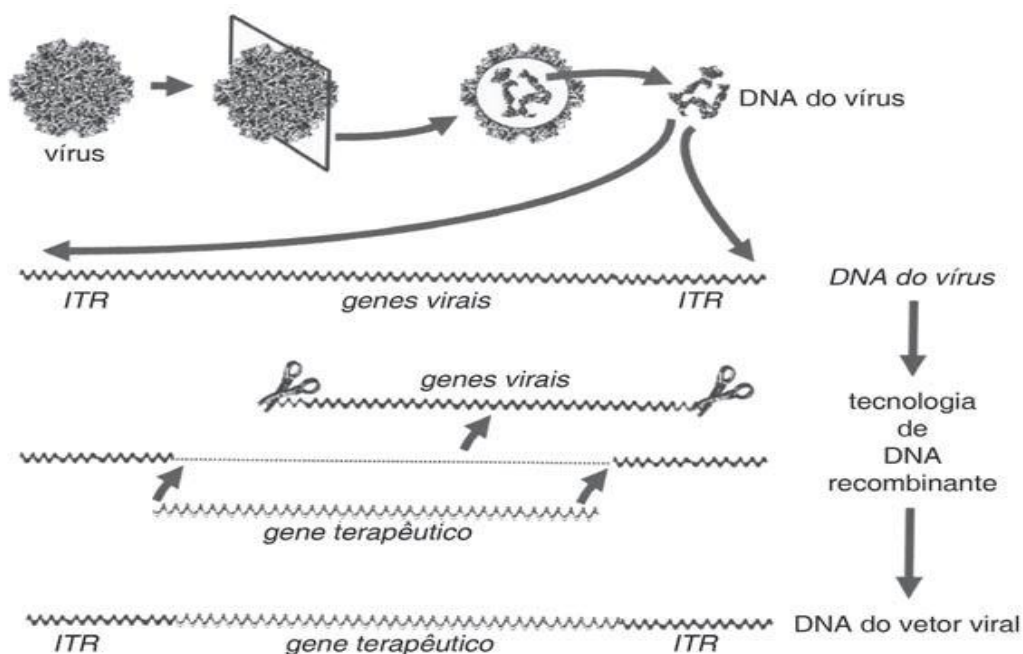


Figura 1: Construção de um vetor viral para terapia gênica. A figura utiliza como exemplo o vírus adenoassociado, cujo material genético é uma fita simples de DNA. Na parte de cima é esquematizado um vírus visto por fora e por dentro, em um corte que mostra a localização do DNA viral. Esse DNA contém vários genes necessários para o ciclo de vida do vírus, isto é, sua multiplicação e recomposição no interior das células. Mas, para usar como vetor, o DNA das regiões terminais, marcadas com a sigla ITR, é o suficiente. O processo consiste em substituir os genes virais pelo gene terapêutico, usando as tecnologias de DNA recombinante. Assim se produz o componente essencial do vetor viral. Entretanto, como o DNA não entra com facilidade nas células, é preciso recompor um vírus parecido.

Fonte: LINDEN, 2008

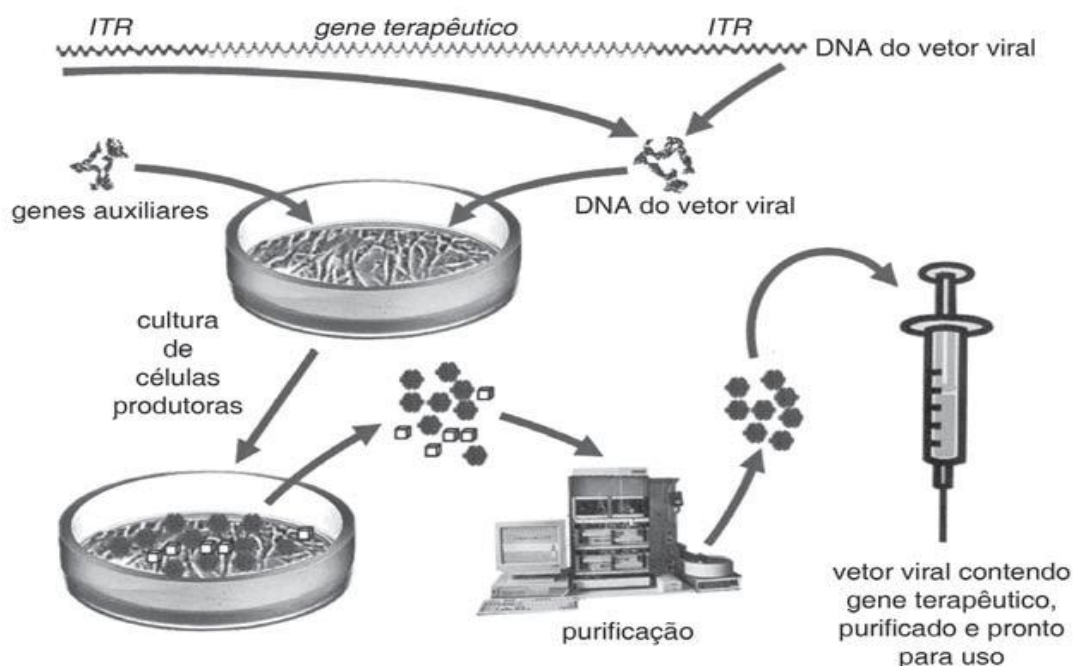


Figura 2: Produção em massa de vetores virais para terapia gênica. A figura utiliza um vetor derivado de vírus adenoassociado. O DNA do vetor viral foi construído e introduzido por precipitação ou eletroporação em células produtoras, junto com um plasmídeo contendo genes auxiliares, os quais são necessários para empacotar o DNA do vetor dentro da estrutura de vírus semelhantes aos adenoassociados originais. As células produtoras formam grandes quantidades de vetores virais completos, juntamente com contaminantes, que são removidos em uma etapa de purificação, após a qual conseguem-se trilhões de partículas virais contendo o gene terapêutico livre de impurezas. O vetor está, assim, pronto para uso.

Fonte: LINDEN, 2008.

5.1.1 Retrovírus

Vetores de retrovírus foram os primeiros sistemas de vetores virais a serem utilizados para terapia gênica (Figura 3). Dentre as vantagens dos vetores retrovirais destacam-se: persistência transgene (devido sua integração ao DNA cromossômico da célula hospedeira) e carência de expressão de proteínas virais na superfície e, conseqüentemente menor resposta imuno-inflamatória (devido à remoção completa do RNA viral codificado no retrovírus recombinante). Porém, esse tipo de vetor apresenta certas desvantagens como: dificuldade técnica na purificação e obtenção de altos títulos do vírus recombinante, possibilidade de originar mutação devida integração aleatória e deficiência em transfectar células que não se dividem (VASQUEZ & MEYRELLES, 2001). Como os retrovírus integram diretamente o genoma de células em divisão, o alvo mais promissor para esses vetores são células que se dividem rapidamente, como as células hematopoéticas e, portanto as principais metas para os vetores retrovirais são

desordens de células-T e neoplasias hematológicas herdadas (WORGALL, 2005).

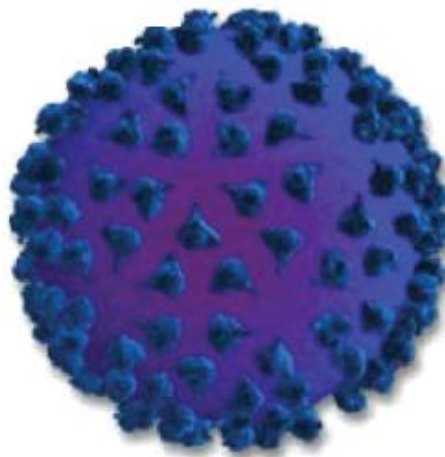


Figura 3: Retrovírus

Fonte: Adaptado de MENCK E VENTURA, 2007.

A simples estrutura genômica dos retrovírus é uma dos maiores atrativos para sua utilização como vetor viral, o qual pode ser administrado por transdução *ex vivo* de células em cultura ou pela administração direta no tecido desejado (VASQUEZ & MEYRELLES, 2001).

5.1.2 Lentivírus

Pertence a família Retroviridae, sendo o genoma composto por duas fitas simples de RNA e enzima transcriptase reversa. Os vírus da imunodeficiência humana (HIV), felina (FIV) e simiana (SIV) são os representantes mais bem conhecidos dos lentivírus devido seus efeitos patológicos (TENÓRIO et al, 2008).

Os Lentivetores são bastante utilizados nos protocolos de terapia, pois são capazes de transferir grande inserto exógeno nas células-alvo, servindo como vetores para o tratamento de inúmeras patologias, como doenças monogênicas, neurológicas e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Possuem baixa imunogenicidade e são capazes de transformar geneticamente células quiescentes, diferentemente de outros tipos de vetores (WORGALL, 2005).

5.1.3 Adenovírus

São bastante utilizados principalmente devido a pouca patogenicidade e ao tropismo amplo por células humanas (Figura 4). No entanto, a grande imunogenicidade e a expressão gênica transiente relacionadas a esses vetores limitam suas aplicações (NARDI, 2002). Podem ser obtidos com altas titulações, são eficientes na infecção de vários tecidos e possuem genoma com DNA dupla fita, o que permite a inserção de grandes sequências de DNA exógeno, exemplificado na figura 5 (MITNE-NETO & ZATS, 2006).

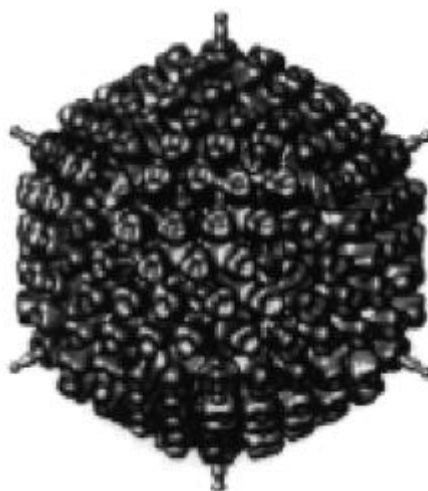


Figura 4: Adenovírus, um dos vetores utilizados na Terapia Gênica
Fonte: Adaptado de MENCK E VENTURA, 2007.

Os vetores de adenovírus têm sido extensivamente modificados para reduzir sua potente imunogenicidade, dessa forma foram eliminados em vetores adenovirais de primeira geração um ou dois genes virais iniciais, E1 e E3 (THOMAS et al, 2003), e substituído pelo gene de interesse terapêutico (VASQUEZ & MEYRELLES, 2001).

Vetores de segunda e terceira geração que contêm deleções adicionais em outros genes precoces (E2 e/ou E4) revelaram toxicidade reduzida em modelos animais (ANDREWS et al. 2001), mas o desenvolvimento de adenovírus dependente-auxiliares (HD-Ads), que possuem todos os genes virais excluídos, tem sido o mais importante avanço para diminuir a imunogenicidade, prolongar a expressão do transgene e melhorar as perspectivas de vetores adenovirais para a terapia genética a longo prazo (THOMAS et al, 2003).

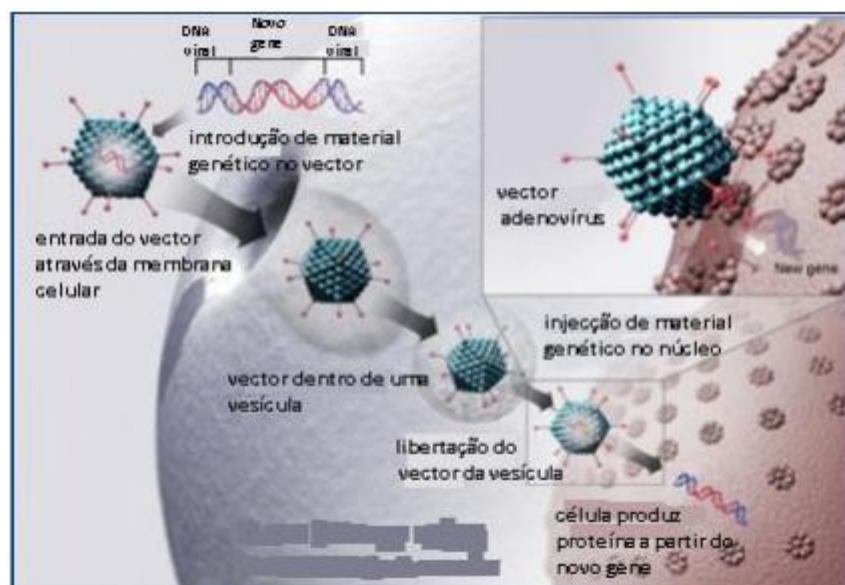


Figura 5: Uso de Adenovírus na Terapia Gênica.
Fonte: Adaptado de Genetics Home Reference

5.1.4 Virus Adeno-associado

O vírus Adeno-associado (Figura 6) é um membro da família parvovirus, seu genoma do tipo selvagem é de 4,7 kb e integra-se no genoma do hospedeiro num local específico do cromossomo 19. Existem pelo menos sete sorotipos conhecidos, sendo que nenhuma doença humana tem sido associada com a infecção por AAV (LINDEN & BERNS, 2000). Podem ser obtidos com altas titulações, possuem DNA fita simples e integram seu DNA ao material do hospedeiro, permitindo expressão prolongada do transgene. No entanto, necessitam de co-transfecção com um vírus auxiliar devido à incapacidade de infectar as células sozinho (NARDI & VENTURA, 2004).

O sorotipo mais comumente usado para vetores de AAV é o 2, que infecta o cérebro e retina muito bem, e assim, foi utilizado para uma vasta gama de aplicações direcionada a esses órgãos (COUTO & PIERCE, 2003).



Figura 6: Vírus Adeno-associado.
Fonte: Adaptado de MENCK & VENTURA, 2007.

5.1.5 Vírus Herpes Simples

Trata-se de um vírus com DNA dupla fita de 152 kb, capaz de se replicar em células hospedeiras, que se dividem e aquelas que não se dividem, nas quais permanecem no estado episomal. Dentre as vantagens de seu uso como vetor esta a capacidade de acomodar no seu genoma sequências de transgene de 20 a 30 Kb. Altos títulos são obtidos facilmente e possui neurotropismo, sendo um dos vetores mais estudados para a doença de Parkinson e tratamento de tumores cerebrais, porém dentre as maiores desvantagens do seu uso está a dificuldade de se obter preparações livre de vírus com capacidade replicativa e pelo potencial de toxicidade na célula transduzida (VASQUEZ & MEYRELLES, 2001).

5.2 VETORES NÃO VIRAIS

Considerando que a transferência de genes por sistemas virais não apresenta uma completa segurança no poder replicativo do vírus, e que podem ocorrer replicações fora das células desejadas, criou-se sistemas de vetores não virais. Estes sistemas sintéticos são em grande parte com base em estruturas policatiônicas (NOVO et al, 2015), portanto, estes métodos de entrega de material genético não envolvem o uso de vírus (SALAZAR-MONTES et al, 2015).

Comparativamente aos métodos virais, estes não apresentam uma eficiência tão elevada quanto à entrega de material genético, nem uma expressão genética estável e prolongada (SANTOS, 2009), porém, a vantagem desses sistemas de vetores é que não ativam a resposta inflamatória e imune do hospedeiro como em alguns sistemas virais (WORGALL, 2005).

Incluem-se em vetores não virais os plasmídeos, lipossomos e conjugação com polímeros inertes e de elevado peso molecular (SALAZAR-MONTES et al, 2015). Destaca-se, ainda, entre vetores não virais, o uso de transferência direta de moléculas, denominada de RNA interferente (MENCK & VENTURA, 2007).

5.2.1 Plasmídeos

Plasmídeos (pDNA) são DNA de dupla fita circular, encontrados em bactérias e alguns outros organismos, que podem carregar um ou mais genes. Eles são capazes de se multiplicar independentemente do cromossomo da bactéria, pois contém sua própria origem de replicação (figura 7). Seu tamanho pode variar de 1 a 250 Kb (BROWN, 2010). Um vetor plasmidial é uma molécula de DNA circular purificada, construída por meio de técnicas do DNA recombinante para conter, além do gene terapêutico de interesse, sequências regulatórias tipo promotores e intensificadores, para facilitar e controlar a expressão do gene. Vetores de DNA plasmidial podem ser introduzidos nas células por métodos físicos, dentre eles: microinjeção direta, eletroporação, injeção de plasmídeo e injeção balística de DNA (DANI, 2000). Apesar da expressão relativamente baixa atingida após uma única administração do plasmídeo, esta expressão é suficiente para atingir níveis fisiológicos e terapêuticos da proteína desejada. Além disso, as melhorias nas técnicas e formulações de plasmídeos foram realizadas para aumentar a taxa de transfecção (COSTA et al, 2014)

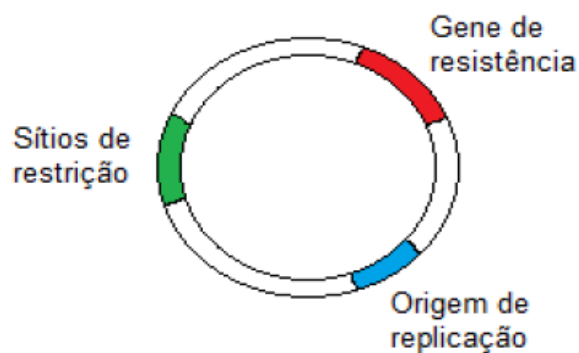


Figura 7: Plasmídeo – com genes de resistência a antibióticos, origem de replicação e os sítios de restrição, onde os genes de interesse podem ser inseridos.
Fonte: BROWN, 2010.

5.2.2 Lipossomas

São vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso e servem como carreadores de fármacos, biomoléculas e agentes de diagnóstico, conforme exemplificado na figura 8 (BATISTA et al, 2007).

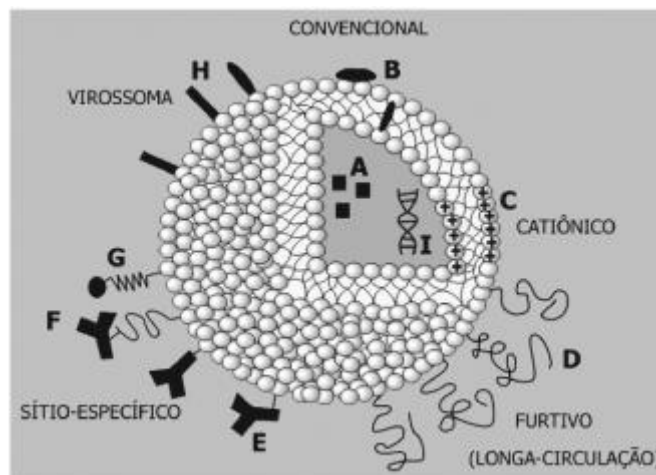


Figura 8: Lipossomas – características estruturais dos vários tipos de lipossomas.
Fonte: BATISTA et al, 2007.

Os lipossomas são considerados como uma nova estratégia para a entrega de medicamentos e genes a células. A utilização de formulações de lipossomas para a entrega de genes *in vivo* é útil para a TG e evitaria vários problemas associados com a distribuição viral (TEMPLETON, 2004), consiste na mistura do DNA desejado com fosfolipídios, resultando na formação de compostos moleculares hidrofílicos envolvidos em moléculas hidrofóbicas, facilitando a passagem do material genético pela membrana celular e protegendo relativamente esse material do ataque enzimático intracelular. Destacam-se na TG por não serem tóxicos nem imunogênicos, transferir genes de qualquer tamanho e para a maioria dos tecidos. Contudo, sua utilização para fins terapêuticos ainda é limitada, devido à baixa taxa de transfecção obtida (VASQUEZ & MEYRELLES, 2001).

5.2.3 Lipídeos catiônicos

Os lipídeos catiônicos utilizados como vetores possuem uma parte hidrofílica carregada positivamente facilitando a interação com as cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA. Essas moléculas, por serem anfifílicas, formam micelas ou lipossomos em meio aquoso, havendo interação eletrostática entre as cargas positivas do lipídeo e as negativas do DNA, resultando na formação de lipoplexos (Figura 9) (MA et al., 2007).

A eficácia de transfecção desses vetores é bastante significativa, porém a toxicidade é o maior obstáculo para o seu uso clínico (BING WANG et al, 2012).

Os grupos hidrofílicos contêm grupos amina e conferem cargas positivas ao lipídeo, sendo esse caráter catiônico dos grupos polares o que mais influencia na toxicidade. Por esse motivo, estudos com modificações nos grupos polares de lipídeos estão sendo realizados para diminuir a toxicidade e aumentar a eficiência de transfecção com DNA ou no silenciamento de mRNA por siRNA (CHEVRE et al, 2011).

Já estão disponíveis comercialmente alguns lipídeos como, a lipofectamina 2000TM e o dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) (BING WANG et al, 2012).

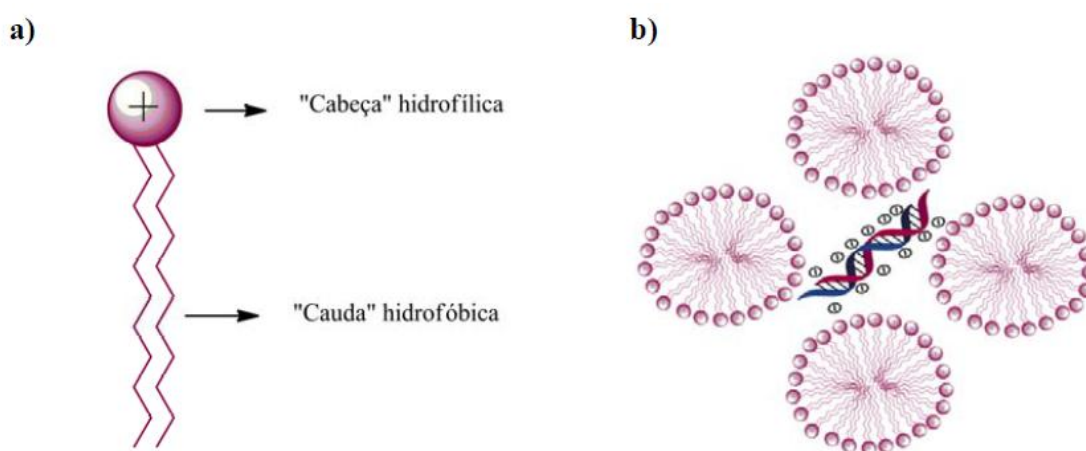


Figura 9: a- Lipídeo catiônico; b- lipoplexo.
Fonte: MA et al, 2007.

5.2.4 RNA Interferente

O fenômeno de silenciamento gênico a partir de moléculas de RNA fita-dupla teve seu mecanismo revelado em 1998, através de experimentos com um verme nematóide (*Caenorhabditis elegans*), sendo que, em 2001, foi comprovada a sua existência também em células de mamíferos. Pequenas moléculas de RNA são sintetizadas nas células, a partir de seu genoma, de modo a produzir estruturas similares a grampos que controlam a expressão de genes celulares, seja a partir da degradação do RNA mensageiro ou bloqueio da síntese proteica. Esse sistema interfere na expressão gênica das células, recebendo assim o nome RNA interferência (RNAi), e esta exemplificado na figura 10 (MENCK & VENTURA, 2007).

O emprego de RNAi como ferramenta de terapia gênica tem sido muito estudado, especialmente em infecções virais, câncer, desordens genéticas herdadas, doenças cardiovasculares e mesmo em doenças reumáticas. Aliados aos dados do genoma humano, os conhecimentos do silenciamento gênico mediado por RNAi podem permitir a determinação funcional de praticamente qualquer gene expresso em uma célula e sua implicação para o funcionamento e homeostase celular (FRANÇA et al, 2010). Resultados promissores e surpreendentes, também têm sido obtidos com aplicação de moléculas de shRNA(short hairpin RNA) através da inalação com administração intranasal, tendo como alvo doenças respiratórias, podendo também auxiliar no tratamento com radiação ionizante e agentes quimioterápicos (MENCK & VENTURA, 2007). O grande potencial da RNAi tem resultado em estratégias bem sucedidas para o silenciamento de uma grande variedade de genes codificadores de proteínas, permitindo obter importantes informações sobre a função desses genes e respectivas proteínas (BERTRAND et al, 2002).

Mesmo que a terapia com RNAi esteja associada a um tratamento com alto grau de especificidade, achados sugerem que os efeitos fora do alvo e outras potenciais complicações podem ser observadas, requerendo ainda, vigorosas investigações referentes à sua eficácia, seletividade, desenvolvimento de estratégias para evitar efeitos fora do alvo e otimização dos sistemas de entrega dos siRNAs (FRANÇA et al, 2010).

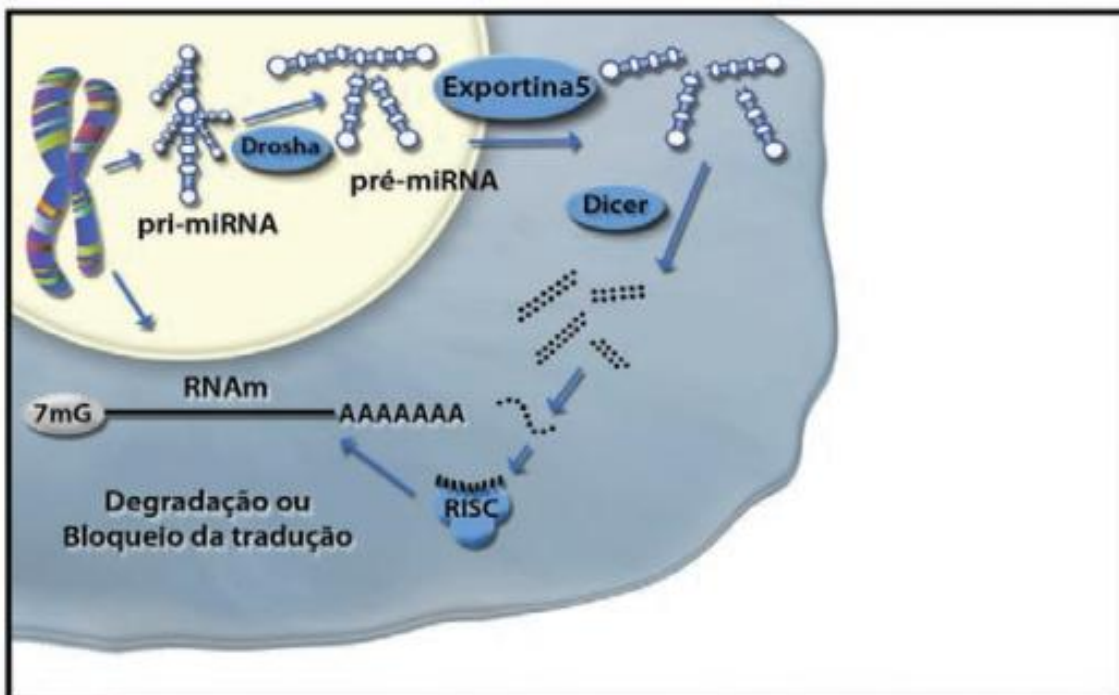
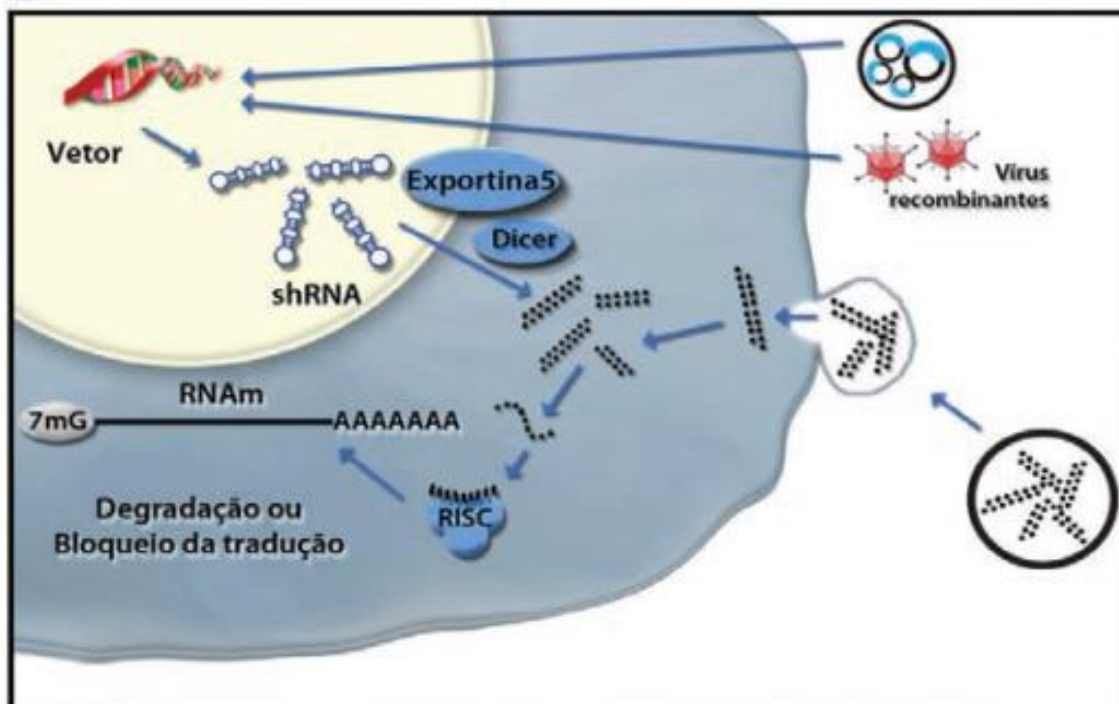
A**B**

Figura 10: Ação de RNA interferência em células animais. A) Esquema do mecanismo de RNAi indicando as principais proteínas/complexos proteicos envolvidos. B) Esquema mostrando como podemos empregar esses mecanismos para provocar silenciamento de genes de forma dirigida, com duplex de RNA (RNAsi), vetores virais ou não para expressão de shRNA (RNA short hairpin).
Fonte: MENCK, 2010.

Para introdução de genes em organismos através da terapia gênica, duas estratégias básicas podem ser utilizadas: *in vivo* e *ex vivo* (figura 11).

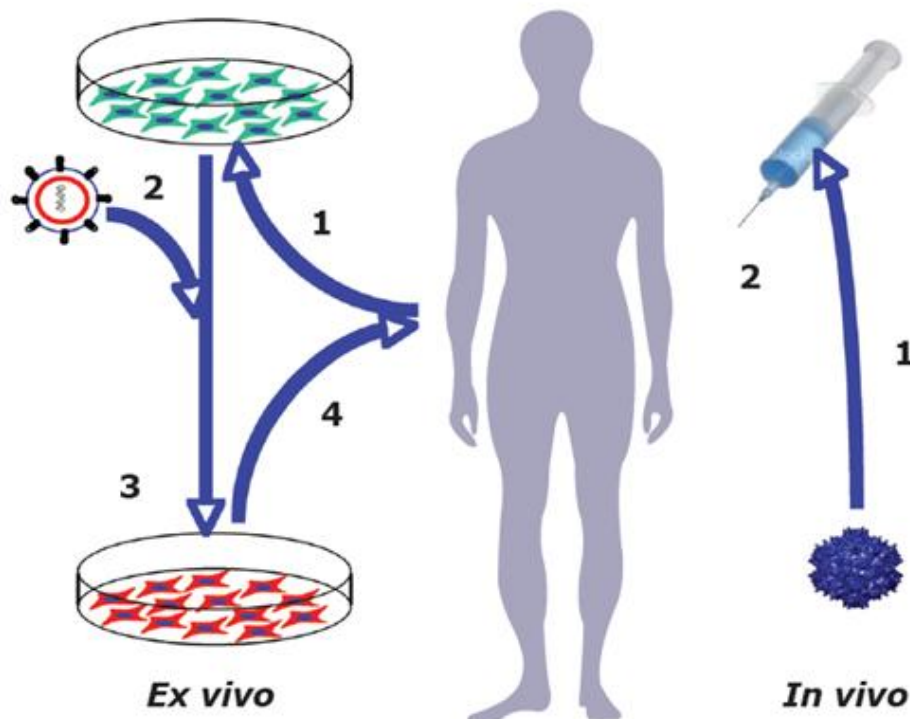


Figura 11: Estratégias de terapia gênica *ex vivo* e *in vivo*. *Ex vivo*: 1.coleta e cultivo *in vitro* das células do paciente; 2.transdução com vetor carregando o gene terapêutico; 3.seleção e expansão das células com gene terapêutico; 4.reintrodução das células modificadas no paciente. *In Vivo*: 1.formulação apropriada do vetor que carrega o gene terapêutico; 2. injeção direta do vetor no tecido-alvo do paciente.

Fonte: MENCK & VENTURA, 2007.

Na estratégia *in vivo*, vetores eficientes podem levar o transgene diretamente ao órgão-alvo adequado por aplicação direta no organismo, levando a eficiente expressão do transgene.

A estratégia *ex-vivo* baseia-se na modificação de células de um tecido alvo, retiradas de um paciente e cultivadas *in-vitro*. Essas células selecionadas, em geral através de uma marca de resistência a antibióticos que são expandidas e reintroduzidas no paciente, irão expressar o gene exógeno desejado (MENCK & VENTURA, 2007).

6 DISCUSSÃO

O tratamento de doenças humanas através da transferência de genes foi originalmente direcionado para doenças hereditárias, causadas normalmente por defeitos em um único gene, como fibrose cística as hemofilias, hemoglobinopatias e distrofias musculares. Entretanto, a maioria dos experimentos clínicos de TG atualmente em curso esta direcionado para o tratamento de doenças adquiridas como AIDS, doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer, devido ao fato dessas doenças adquiridas apresentarem uma alta incidência na população mundial quando compara a frequência das doenças monogênicas, assim ensaios clínicos bem sucedidos para essas enfermidades poderiam trazer benefícios a um numero muito maior de pacientes (NARDI et al, 2002).

Para ilustrar as aplicações potenciais da TG alguns exemplos são listados a seguir.

6.1 HEMOFILIA

As hemofilias A e B são enfermidades, decorrentes de deficiências quantitativas ou de defeitos moleculares dos fatores VIII e IX respectivamente, de transmissão hereditária recessiva, ligada ao cromossomo X. Caracteriza-se por manifestações hemorrágicas prolongadas ou espontâneas, principalmente em articulações, músculos e órgãos internos (HOEPERS, 2008).

O procedimento na TG é introduzir o gene sadio em células do paciente para que essas passem a produzir a proteína necessária. Com a terapia o organismo deve não apenas voltar a produzir a proteína que falta, mas produzi-la em quantidade suficiente para reestabelecer a saúde do paciente e por longo prazo, idealmente por toda a vida (LINDEN, 2010).

Os genes do fator de coagulação estavam entre os primeiros a ser clonados no início de 1980 e traços recessivos como as hemofilias tornaram-se rapidamente metas para a aplicação de TG em células somáticas. Ao longo das últimas três décadas, muitas estratégias têm sido utilizadas para conseguir a expressão persistente e com nível terapeuticamente relevante de fator VIII (FVIII)

e fator IX (FIX) em modelos animais de hemofilia. Na verdade, não tem tido muito êxito estratégias de transferência de vários genes com o longo-termo "cura" da hemofilia A e B, em camundongos e em números menores de animais de grande porte. No entanto, sucessos semelhantes não tinham sido documentados em doença humana até muito recentemente (HIGH et al, 2014).

Estudos utilizando dose elevada de um vetor derivado de vírus adenoassociado (rAAV), contendo o gene codificante do fator IX em pacientes com hemofilia B por infusão hepática, apresentou entre duas e cinco semana após o tratamento níveis terapêuticos de fator IX circulante acima de 10% da atividade normal, que é suficiente para sustentar a capacidade de coagulação sanguínea. Entretanto, o efeito terapêutico foi transitório, desaparecendo seis semanas após o tratamento, acompanhado de aumento temporário e assintomático de níveis de transaminases. Os resultados deste e de outro paciente no mesmo estudo indicaram que os efeitos terapêuticos foram abolidos por degeneração das células do fígado nas quais foi introduzido o vetor, causada por uma resposta imune contra proteínas do vetor viral (MINGOZZI & HIGH, 2007).

Com base em resultados clínicos encorajadores utilizando vetores lentivirais, estudos pré-clínicos utilizando engenharia genética HSCs para tratar hemofilia A estão avançando no sentido de ensaios clínicos. Promotores específicos de plaquetas têm sido utilizados para tratar tanto modelos de hemofilia A murina e canina. Pensa-se que esta tecnologia pode ser mais útil no contexto de pacientes com inibidores de FVIII pré-existente. Projetos de lentivírus usando promotores com expressão padrões mais onipresente têm avançado para o estágio de avaliação pela FDA (*Food and Drug Administration*). Embora os estudos iniciais utilizando retrovírus-modificado recombinante HSCs tenham mostrado limitada expressão de FVIII em camundongos transplantados com hemofilia A, estudos recentes utilizando sequências geneticamente modificadas de FVIII tem mostrado expressão terapêutica de FVIII em longo prazo. Ensaio clínicos utilizando um vetor lentiviral de auto-inativação tem sido bem avaliado pela *US Recombinant DNA Advisory Committee*, e espera-se, portanto, que haja aprovação clínica para utilização de lentivírus na terapia genética para hemofilia A (HIGH et al, 2014).

Resultados demonstram a necessidade de cautela na transição de estudos pré-clínicos para ensaios clínicos, mesmo na ausência de efeitos adversos sérios, e forneceu dados cruciais para o avanço da aplicação clínica de terapia gênica. Novos estudos experimentais estão em andamento, visando evitar essa resposta imunitária com o emprego de variantes do vetor e imunossupressão transitória, que guiarão novos ensaios clínicos (HASBROUCK & HIGH, 2008).

6.2 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA SEVERA COMBINADA LIGADA AO X (SCIDX1)

A SCID ligada ao cromossomo X é realmente a forma mais comum de SCID, respondendo por 40% -50% dos casos notificados no mundo SCID. As mutações no gene IL2RG estão a conduzir à expressão do defeito comum a cadeia gama (γ c), uma subunidade partilhada por uma série de receptores de citocinas, incluindo o complexo de receptores de interleucina (IL) -2, 4, 7, 9, 15 e 21, que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e função de linfócitos (MUKHERJEE & THRASHER, 2013). Como consequência, os pacientes SCID-X1 apresentam profundos defeitos imunológicos causados por números baixos ou a ausência completa de células T e NK, e presença de células B não funcionais. Morte por infecções adquiridas na comunidade ou oportunistas geralmente ocorre antes de 1 ano de idade, a menos que o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico seja realizado (FISCHER & CAVAZZANA-CALVO, 2008).

SCID-X1 foi considerado o modelo mais preciso para avaliar a TG, porque a reversão espontânea da mutação no gene que codifica IL2RG- γ c levou a restauração da competência imunológica, o que sugere que as células progenitoras de linfócitos transduzidas poderiam transportar uma vantagem seletiva sobre homólogos não transduzidos ((MUKHERJEE & THRASHER, 2013), porém alterações do genoma foram encontrados em todos os pacientes submetidos a terapia e, provavelmente, responsável pelo desenvolvimento de leucemia (3), favorecida pela vantagem seletiva que lhes são atribuídas pela expressão concomitante do gene γ c. Devido a ocorrência de complicações

graves, foi solicitado a interrupção dos ensaios para SCID-XI (CAVAZZANA-CALVO et al, 2012).

Para melhorar a segurança mantendo o perfil de eficácia para a terapia gênica X-SCID, uma auto-inativação (SIN) do vetor γ -retroviral com o vírus da leucemia murina de Moloney deletado LTRU3 potenciador foi explorado, expressando IL2RG DNA complementar fator de alongamento eucariótico humano 1 α (EF1 α) promotor curto, e tendo demonstrado ser menos mutagênico in vitro. Os resultados provisórios dos primeiros nove pacientes tratados em fase 1/2 em ensaios paralelos realizados em Londres, Paris, Boston, Cincinnati, e Los Angeles foram recentemente publicados. Oito dos nove doentes tratados sobreviveram, enquanto que uma infecção disseminada por adenovirus preexistente foi fatal para um paciente de 4 meses após TG, antes da reconstituição completa do compartimento de células T. Até os 48 meses de acompanhamento, a reconstituição imune de células T ocorreu em outros 7 pacientes. É importante ressaltar que a análise de integração mostrou um perfil de integração policlonal com redução do número de clones próximos conhecidos proto-oncogenes e genes linfóides implicados em eventos adversos graves em ensaios TG anteriores (HACEIN-BEY-ABINA et al, 2014).

6.3 SÍNDROME WISKOTT-ALDRICH (WAS)

A Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) é uma imunodeficiência rara, ligada ao X, sendo a trombocitopenia congênita com plaquetas pequenas a principal característica do diagnóstico da WAS. Muitos pacientes apresentam diarreia sanguinolenta no primeiro mês de vida. Eczema, que ocorre em alguns, mas não em todos os pacientes, pode ser o problema clínico predominante. Otites, sinusites e infecções devido a herpes simplex e EBV são particularmente problemáticas. Muitos pacientes apresentam aumento de IgE e IgA, com IgM baixa. Número de células T e função declina com a idade. Há um aumento da incidência de manifestações autoimunes (vasculite, anemia hemolítica, glomerulonefrite) e neoplasias (leucemia, linfoma, tumor cerebral EBV-relacionado) (GONZALES & CARVALHO, 2011).

A WAS é uma imunodeficiência ligada ao X causada por mutações no gene que codifica sua proteína (WASp), a qual é expressa no citoplasma de todas as células hematopoiéticas, incluindo as células tronco (CD34+), plaquetas, linfócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, participando da transdução de sinais da superfície da célula para o citoesqueleto de actina. Portanto, a WASp está envolvida na locomoção celular, sinalização celular e formação da sinapse imune. Também participa do processo de fagocitose e de apoptose (NOTARANGELO et al, 2008).

Devido à perturbação da homeostase de células B em pacientes com o WAS, a restauração da competência imunológica é um dos principais objetivos terapêuticos. Um ensaio de reconstituição do compartimento de células B em 4 pacientes que receberam células-tronco hematopoéticas autólogas transduzidas com um vetor lentiviral depois um regime de condicionamento de intensidade reduzida combinada com administração de anti-CD20, mostrou que a TG mediada por vetores lentivirais, ocasionou o aumento progressivo de células B transduzidas no sangue periférico de todos os pacientes. As células progenitoras transduzidas por vetores lentivirais foram capazes de repovoar o compartimento de células B com uma normalidade distribuição de subpopulações de células B tanto na medula óssea como periferia, que mostra um perfil de expressão de proteínas WAS semelhante ao que de doadores saudáveis. Além disso, depois de TG, observou-se uma frequência normalizada de células B auto-imune associada CD19⁺ CD21⁻ CD35⁻ e CD21^{low} e uma redução nos níveis de fator de ativação de células B. Os níveis séricos de imunoglobulina e produção de auto-anticorpos melhorado em todos os pacientes tratados. Os resultados do ensaio forneceram evidências de que a TG mediada por vetor lentiviral induz a expressão do transgene no compartimento de células B, resultando no desenvolvimento de células B e melhora da funcionalidade, contribuindo assim, para a melhoria imunológica em pacientes com WAS (CASTIELLO et al, 2015).

6.4 AMAUROSE CONGÊNITA DE LEBER (*LEBER'S CONGENITAL AMAUROSIS - LCA*)

A LCA é uma doença que provoca cegueira progressiva, iniciando-se com perda importante de visão em bebês e progredindo ao longo do tempo para cegueira total. Inicialmente, os fotorreceptores, células retinianas sensíveis à luz e imprescindíveis para a visão, são inativados, mas permanecem vivos na retina, e sua degeneração costuma acontecer por volta dos 30 anos de idade (HOLLANDER et al., 2008). Há várias formas de LCA, algumas de causa genética já bem conhecida, como a deficiência na RPE65, uma enzima necessária para produzir o derivado da vitamina A, essencial para o funcionamento dos fotorreceptores (BERETA et al, 2008). Atualmente, há mutações em 11 genes identificados responsáveis pela amaurose congênita de Leber: GUCY2D, RPE65, RDH12, AIPL1, C6ORF152, RPGRIP1, CRX, CRB1, CEP290, IMPDH1, mas estudos recentes identificaram que RPE65 (proteína presente no EPR) é a isomerase que converte 11-cis-retinal em all-trans-retinal, sendo que, na falta dessa proteína, não há formação de pigmento visual, ocorrendo acúmulo da vitamina A por bloqueio do ciclo visual (LE MEUER et al, 2007).

Em ensaio com cães, obtiveram sucesso, ao injetar via sub-retiniana, vetores AAV carregando o gene RPE65 diretamente nos olhos. Observaram que a função retiniana melhorou em menos de quatro semanas, persistindo até nove meses nos animais entre dois e onze meses de vida, sendo que acima de dois anos e meio o tratamento é ineficiente já que a degeneração retiniana está em estágio mais avançado. Pela primeira vez, reportaram o aumento nas respostas da eletrorretinografia em ambos os olhos e não apenas no olho de estudo (NARFSTRÖM et al, 2003). Ensaios realizados em humanos três pacientes foram submetidos à injeção sub-retiniana durante vitrectomia com vetor AAV, apenas um teve melhora da acuidade visual, fato explicado devido à patologia estar no estágio mais brando que nos outros pacientes e a administração ser realizada no olho amblíope (BAINBRIDGE et al, 2008). Em outro estudo semelhante, obtiveram sucesso utilizando AAV com injeção sub-retiniana e vitrectomia no olho amblíope em três pacientes. Todos tiveram melhora da

acuidade visual após seis semanas, redução do nistagmo e aumento do reflexo pupilar à luz. Nos ensaios não houve evidência de toxicidade, inflamação e efeitos adversos ao tratamento, sugerindo que o tratamento poderia ser mais eficiente se realizado em crianças onde a degeneração da retina é menor podendo melhorar a função visual (MAGUIRRE et al, 2008).

6.5 CÂNCER

A maioria dos ensaios clínicos de terapia gênica tem sido feita em pacientes de câncer, em geral em estágios avançados, sendo que o efeito desejável de qualquer tratamento de câncer é o de provocar a morte seletiva das células tumorais. O procedimento apelidado de “técnica de genes suicidas” consiste em introduzir nas células tumorais um gene que não existe no genoma humano e codifica a enzima timidina cinase, proveniente do genoma herpesvírus. Essa enzima na presença de uma droga chamada ganciclovir, mata a célula, pois a enzima transforma o fármaco toxina que só afeta as células que se multiplicam (figura 12).

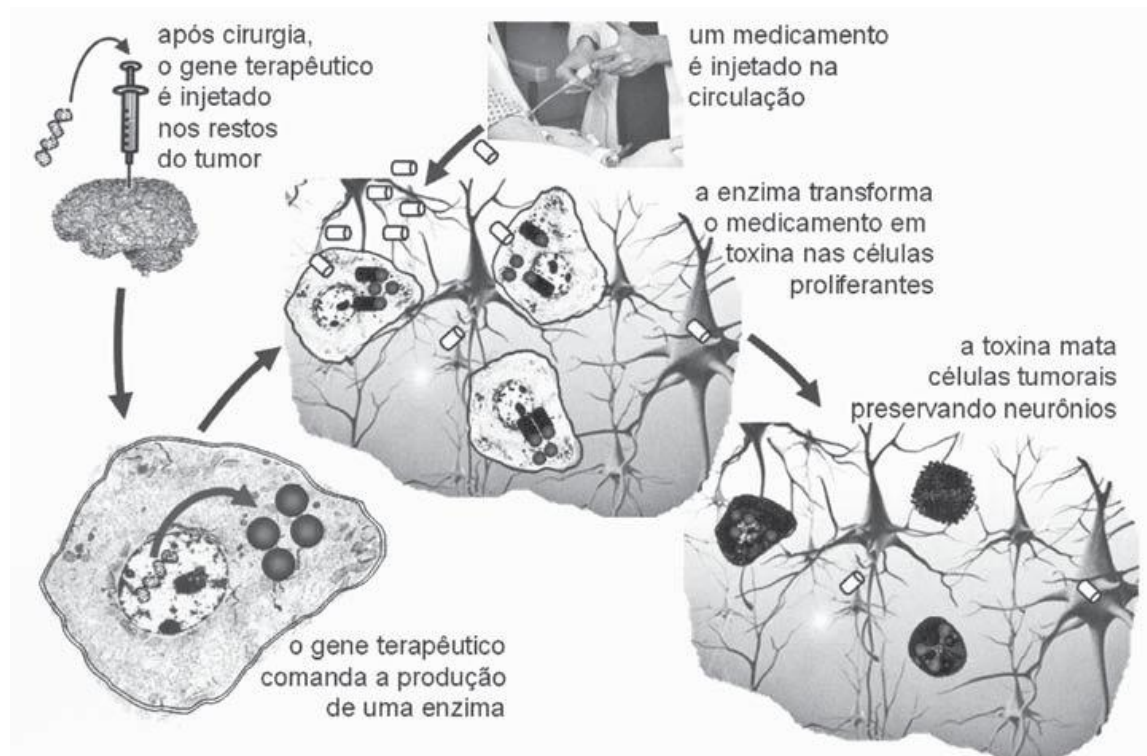


Figura12: Mecanismo de ação de genes suicidas. O exemplo refere-se à glioblastomas, mas também se aplica a outros tipos de tumores. Primeiro, o neurocirurgião remove o máximo possível do tumor, restando células tumorais dispersas entre os neurônios normais do cérebro. O gene terapêutico (HSV-TK ou timidina cinase) é injetado na região operada, penetrando nas

células nas células e comandando a produção da enzima. Essa enzima fosforila o ganciclovir injetado, transformando-o em uma toxina poderosa que se incorpora ao DNA das células-alvo, bloqueando a replicação do DNA e levando, eventualmente, à morte da célula proliferante.
Fonte: LINDEN, 2008.

Embora a eficácia da tecnologia de gene suicida para tratamento de tumores seja ainda controversa, alguns estudos obtiveram resultados animadores, entre eles, um ensaio clínico de fase I/II realizado na Finlândia, no qual a ressecção de glioblastomas, foi seguida por injeção no leito cirúrgico, de um vetor adenoviral, contendo o gene da timidina cinase de herpesvírus. O procedimento prosseguiu com injeções endovenosas diárias de ganciclovir por 14 dias, o que resultou em aumento significativo da sobrevivência do grupo de 17 pacientes tratados por terapia gênica, quando comparado a um grupo de 19 pacientes tratados com terapia convencional, ou quando comparado a uma população controle de 36 pacientes previamente tratados por métodos convencionais na mesma unidade de neurocirurgia, nos dois anos anteriores ao ensaio (IMMONEN et al., 2004).

6.6 RISCO-BENEFÍCIO NA TERAPIA GÊNICA

A maioria dos ensaios clínicos de TG já encerrados se destinou a testar a segurança do procedimento, a identificação de efeitos adversos precoces durante estudos, foi suficiente para encerrar imediatamente o teste, evitando risco de agravamento, mas em muitos casos, procedimentos foram considerados seguros, quando muito com efeitos adversos ocasionais, discretos e toleráveis. Dor ou inflamação leve no local da injeção, febre baixa transitória, dor de cabeça passageira, sintomas semelhantes à gripe e outros efeitos suaves são, em geral, toleráveis em vista do potencial de tratamento de uma doença incurável. Esses são a maior parte dos incidentes que se costuma encontrar nos ensaios clínicos de fase I em terapia gênica, especialmente após a realização de extensos testes pré-clínicos em animais (LINDEN, 2010).

A terapia gênica, pode ocasionar reações adversas que variam na severidade, mas que em certos casos, podem levar a morte. Os casos citados constituem os mais graves efetivamente caracterizados como efeitos adversos da terapia gênica, e possuem origem em características dos vetores virais utilizados. Porém, em ambos os casos, a pesquisa fundamental, aliada à observação criteriosa dos eventos associados ao tratamento e ao curso clínico

dos efeitos colaterais, contribuiu para avanços no desenho e produção de novos vetores, destinados a evitar tais efeitos adversos (LINDEN, 2010).

Jesse Gelsinger, 18 anos de idade, em setembro de 1999, participou de um ensaio clínico de TG na Universidade da Pensilvânia, na Filadélfia. Gelsinger sofria de uma deficiência parcial de ornitina transcarbamilase (OTC), uma enzima do fígado necessária para a remoção do excesso de nitrôgenio de aminoácidos e proteínas. A deficiência de OTC conduz a um acúmulo de amônia na corrente sanguínea, o que, por sua vez, provoca uma elevação de íons de amônio no cérebro, levando a encefalopatia, dano cerebral e coma. A Universidade da Pensilvânia concebeu o ensaio para testar a segurança da utilização de vetores adenovirais de segunda geração E1 e E4 suprimida, para entregar o gene de OTC para o fígado. A terapia era destinada a bebês que sofriam de deficiência OTC grave e fatal, mas preocupações éticas sobre a capacidade dos pais em dar consentimento informado sobre a doença dos seus filhos significava que o julgamento de segurança seria realizado em 18 voluntários adultos relativamente capazes de julgamento que tiveram apenas uma forma leve da doença, que foi controlado com dieta e medicamentos. Gelsinger recebeu a maior dose de vector no julgamento ($3,8 \times 10^{13}$ partículas). Uma paciente do sexo feminino que recebeu uma dose semelhante ($3,6 \times 10^{13}$ partículas) não experimentou efeitos colaterais inesperados. Mas Gelsinger, 4 horas após o tratamento, desenvolveu uma febre alta. Na manhã seguinte, ele estava exibindo sintomas de lesão hepática e coagulação intravascular disseminada. Dentro de quatro dias Gelsinger morreu de falência múltipla de órgãos. A morte de Jesse Gelsinger foi diretamente atribuída à administração do vetor adenovírus. A autópsia revelou que, embora o vetor tivesse sido infundido diretamente para o fígado através da artéria hepática, quantidades substanciais do vetor tinham disseminado na circulação e acumulado no baço, nódulos linfáticos e medula óssea. A entrega sistêmica do vetor desencadeou uma resposta inflamatória maciça que levou à coagulação intravascular disseminada, insuficiência respiratória aguda e falência múltipla de órgãos (NIH, 2002).

Em abril de 2000, um documento foi publicado na revista Science, que marcou o ponto mais alto na história turbulenta de terapia genética. Em um artigo intitulado "A terapia genética humana da doença imunodeficiência severa combinada (SCID)- XI", Maria Cavazzana-Calvo, Alain Fischer e seus colegas do

Hospital *Necker for Sick Children* em Paris relatou a primeira cura definitiva de uma doença por terapia genética (CAVAZZANA-CALVO, 2000). Três crianças que sofriam da Síndrome fatal ligada ao X SCID-XI tinham desenvolvido sistemas imunitários funcionais após a reinfusão de células estaminais hematopoéticas que foram transduzidas *ex vivo* com um vetor de MLV que realizou o gene que codifica um receptor para a citocina cadeia C- γ . Sem o receptor da cadeia γ -c, os linfócitos em desenvolvimento são incapazes de responder a sinais de citocina e maturar em células T funcionais e células *natural killer* (NK). Desde a publicação do presente relatório, vários outros pacientes foram tratados com a mesma terapia gênica com sucesso aparente, mas a euforia tornou-se ansiedade após o desenvolvimento de leucemia em dois dos pacientes de Fischer. Pensa-se que as células T cancerosas em ambos os pacientes são derivadas de células individuais transduzidas, em que o genoma do retrovírus foi inserido perto, ou em, o domínio do oncogene LIM2 (LMO2), ativando expressão de LMO2 (CHECK, 2002). A inserção semelhante na região LMO2 foi identificada em um terceiro filho no estudo SCID-XI, embora essa criança não tenha desenvolvido leucemia. No ensaio SCID-XI, células estaminais hematopoéticas, que são geneticamente manipuladas com o receptor da citocina cadeia γ -c necessária para passar por muitas divisões celulares para gerar uma célula T funcional repovoamento repertório. Embora já houvesse uma forte seleção de células modificadas geneticamente para proliferar, a ativação da expressão do gene LMO2 provavelmente impulsionou a capacidade desses de proliferar esses clones a ponto de malignidade. Portanto, parece provável que o câncer nos dois pacientes SCID-XI foi uma consequência de uma combinação específica de vetor, transgene e alvo da doença (CHECK, 2003).

Em ensaios clínicos mais recentes, realizados na França e Inglaterra, de 20 crianças abaixo de um ano de idade submetidas à terapia gênica para síndrome de imunodeficiência combinada severa ligada ao cromossomo X (SCID-XL) cinco desenvolveram leucemias. Dessas, uma foi a óbito e quatro apresentaram remissão completa da leucemia após quimioterapia. Exames feitos após o aparecimento das leucemias revelaram que os vetores retrovirais utilizados em ambos os ensaios produziram mutagênese insercional, ou seja, mutações produzidas pela intromissão do vetor no DNA, rompendo a continuidade da sequência genética (CAVAZZANA-CALVO & FISCHER, 2007).

O balanço de efeitos adversos e benefícios em ensaios clínicos de terapia gênica indicam que o curso do desenvolvimento das terapias avançadas, tais como os tratamentos com células-tronco, será tanto mais seguro quanto mais bem fundamentado pela pesquisa básica e sujeito a regulamentação adequada para restringir a autorização de ensaios clínicos à condição de máxima segurança possível na época dos ensaios, porém sem tolher o avanço da pesquisa médica. A análise dos efeitos adversos tem contribuído para orientar o desenvolvimento biotecnológico na área e aperfeiçoar a regulamentação e os critérios para autorização de ensaios clínicos.

As primeiras etapas de desenvolvimento de tecnologias estão ao alcance de grupos de pesquisas, institutos e universidades públicas, bem como entidades privadas financiadas com recurso público, porém a transferência da pesquisa laboratorial para o ensaio clínico demanda de recursos que estão geralmente muito além da capacidade de financiamento público. Dessa forma, companhias de biotecnologia investem na realização desses ensaios em razão das patentes que eventualmente possam vir a ser exploradas comercialmente. Até o momento apenas um produto classificado especificamente como TG foi aprovado e outros quatro encontram-se em fase adiantada no caminho da comercialização, conforme exposto na tabela 1 (LINDEN, 2010).

Produto	Composição	Indicação	Empresa	Status
Gendicine®	rAd-p53	Tumores de cabeça e pescoço	SiBiono GenTech, China	Aprovado e no mercado na China (2003)
Rexin-G®	tumor matrix (collagen)-targeted, retroV-dnG1-Cyclin	Tumores sólidos	Epeius Biotech, EUA	Uso compassionado no Japão (2007), aprovado nas Filipinas
Collatogene®	Plasmid-HGF	Isquemia crítica de membros	AnGes MG/ Daiichi Sankyo, Japão	Sob revisão no Japão, análise de protocolo especial (SPA) nos EUA
Advexin®	rAd5CMV-p53	Tumores de cabeça e pescoço	Introgen, EUA	Sob revisão, ensaio fase II em andamento
Cerepro®	rAd5-TK	Glioblastoma	Ark Technologies, ING/Finlândia	Aprovado para uso individualizado na França e Finlândia (2009)

Tabela 1: Produtos de TG em estágio avançado de desenvolvimento.
Fonte: Linden, 2010.

A União Europeia, desde 1984, tem empreendido sete programas-quadro (PQ), dedicados à investigação e inovação, com períodos de 5-7 anos. Durante o quinto, sexto e sétimo PQ, mais de € 351 milhões foram investidos em 110 projetos no campo da transferência de genes e da terapia gênica. Atualmente, 15 projetos do 7º PQ de terapia genética incluem ensaios clínicos principalmente para pacientes que sofrem de uma doença rara ou câncer, mas também de doenças mais frequentes, tais como restrição do crescimento fetal grave ou degeneração macular relacionada à idade. O programa de investigação e inovação oitavo, Horizon 2020 (2014-2020), foi concebido como um dos meios fundamentais para impulsionar o crescimento econômico e a criação de emprego, abordando todo o ciclo da inovação, desde a pesquisa básica até a implementação. O Horizon 2020 tem três pilares principais: a excelência científica, liderança industrial e desafios societais. O desafio abordando principalmente a pesquisa em saúde no âmbito do novo programa terá um orçamento de € 7,4 mil milhões, concentrando-se em projetos de terapia gênica e celular em doenças crônicas e raras, bem como medicina regenerativa e terapias avançadas, conforme disposto na Tabela 2.

O campo desenvolveu-se consideravelmente nos últimos anos e agora está maduro para desafios clínicos. O Consórcio de Pesquisa de Doenças Raras Internacionais (IRDiRC), inicialmente estabelecido pela comissão Europeia e os Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos, vai apoiar temas como doenças raras, sendo proposto um projeto para 2014 e dois para 2015. O consórcio visa desenvolver 200 novas terapias e meios para diagnosticar doenças mais raras até 2020. O primeiro pilar do Horizon 2020 oferece oportunidades para a ciência de investigação de fronteira através de suas doações do Conselho Europeu de Investigação. O segundo pilar garantiu o apoio a artistas de investigação e inovação, incluindo um apoio significativo para pequenas e médias empresas desenvolver instrumentos específicos. Este tópico é complementar a iniciativa sobre medicamentos inovadores (IMI), a maior parceria público-privada da Europa entre a Comissão, a Federação Europeia de Indústrias Farmacêuticas e Associações, no sentido de promover o desenvolvimento de novos e melhores diagnósticos e terapias para os pacientes. A IMI renovada com um orçamento de € 3,5 mil está prevista para o período de 2014-2020. Recentemente, o primeiro produto de terapia genética humana na

Europa, Glybera, entrou no mercado. Constitui um dos quatro medicamentos de terapia avançada aprovados pela Agência Europeia de Medicamentos desde 2009 (GANCBURG & DRAGHIA-AKLI, 2014).

Tópicos de Desafios Societais	Desafio Específico	Resumo do Âmbito
2014/2015- Pesquisa clínica de medicina regenerativa	Investigação específica necessária para provar a segurança, eficácia, e repetibilidade de novos tratamentos em ensaios clínicos de medicina regenerativa.	As propostas devem se concentrar em terapias de medicina regenerativa, a pesquisa clínica (in-paciente) pode dirigir-se a qualquer doença ou condição. Os proponentes devem ter ou estar perto de ter as autorizações éticas e regulatórias necessárias para realizar o trabalho.
2014-Novas terapias para doenças crônicas não transmissíveis	Desenvolvimento de novas terapias está estagnado devido à falta de validação clínica.	Ensaio clínico (s) apoio a avaliação do novo conceito terapêutico (s) e / ou otimização do conceito de terapias disponíveis. Aplicação de pesquisa clínica pré-existente e construção de banco de dados com resultados. Se for o caso, deve ser fornecida a avaliação de viabilidade e eficácia.
2014- ERA NET: investigação das doenças raras e implementação dos objetivos IRDiRC	Na área das doenças raras, promover a cooperação transnacional e partilha de recursos durante o desenvolvimento de normas comuns e prioridades de investigação.	Coordenar as propostas de pesquisas nacionais e regionais para doenças raras e implementar os objetivos IRDiRC. Promover a compreensão dos mecanismos da doença e a história natural das doenças raras com objetivo de desenvolver novas ferramentas de diagnóstico e tratamento. As propostas devem ser complementares a outros programas de financiamento a nível Europeu e internacional.
2015-Novas terapias para doenças raras	Problemas específicos no desenvolvimento de terapia para doenças raras incluem: pequenas e dispersas populações de pacientes/ natureza das terapias propostas obstáculos regulatórios/ mercado limitado de fornecimento, baixo retorno comercial.	As propostas podem abordar um ou mais dos seguintes procedimentos: Desenvolvimento de abordagens terapêuticas novas ou melhoradas, para terapia gênica ou celular a partir de pequenas moléculas. Reaproveitamento de terapias existentes. Investigação pré-clínica, desenvolvimento do modelo animal, e produção de GMP.
2015- Ferramentas e tecnologias para as terapias avançadas	Novas terapias, tais como terapia gênica e celular, engenharia de tecidos, medicina regenerativa requerem inovação tecnológica para proporcionar aos pacientes tratamentos inovadores e alcançar a conformidade regulamentar.	As propostas devem incidir em refinar um passo tecnológico particular ou componente necessário para a abordagem terapêutica Estabelecer prova de conceito para a nova tecnologia e realização de investigação pré-clínica podem ser incluídos, se necessário. Aspectos regulamentares da nova tecnologia devem ser tratados como apropriado.
2015- Apoio as redes europeias de referencia: modelagem de rede eficiente e validação.	Centros especializados capazes de colaborar, coordenar e partilhar seus conhecimentos através das fronteiras. É necessário o projeto de demonstração e validação de RER como um modelo inovador de cooperação e de trabalho entre os prestadores de cuidados de saúde altamente especializados.	Estabelecimento de prova de conceito para a nova tecnologia e realização de investigação pré-clínica podem ser incluídos, se necessário. Aspectos regulamentares da nova tecnologia devem ser tratados como apropriado. As propostas devem prestar um apoio coordenado para as atividades dos RER no quadro das realções diretas à validação de um modelo para a organização ideal, governança, manutenção e monitorização contínua e avaliação do RER e seus centros.

Tabela 2: Seleção de Projetos Horizon 2020: oportunidades de financiamento (terapia gênica e celular).

Fonte: GANCBURG & DRAGHIA-AKLI

A droga é a esperança de uma vida sem sofrimento para milhares de pessoas que possuem uma doença genética rara, caracterizada por um defeito no gene que determina a produção da enzima lipoproteína lipase, responsável pela digestão da gordura. Sem ela, o corpo não metaboliza o nutriente, o que acarreta sérias consequências, como sucessivas internações por pancreatite (inflamação do pâncreas). Até hoje, não havia tratamento a não ser dieta restritiva. O remédio troca o gene defeituoso por um saudável, corrigindo o problema. Para concluir o desenvolvimento do Glybera foram 12 anos de trabalho, realizado pela companhia de biotecnologia holandesa UniQure. Isso porque a substituição do gene defeituoso pelo correto envolve um processo complexo. O vetor escolhido foi o vírus adeno-associado, pois provoca menos reações do sistema imunológico, é mais fácil de manipular e não causa enfermidades, por precauções são utilizados drogas para evitar a rejeição. Com 12 injeções aplicadas diretamente em músculos da perna dadas de uma só vez, os 27 pacientes que participaram dos testes – realizados no Canadá e na Holanda – passaram finalmente a fabricar a enzima e continuaram sua produção sem necessidade de novas injeções. No mundo científico, a façanha foi comemorada. Por enquanto, a droga só está disponível na Europa e está sendo submetida à aprovação nos EUA. Mas é possível o tratamento de pessoas de outras partes do mundo. O tratamento é avaliado ao equivalente a R\$ 3 milhões (OLIVEIRA, 2013).

Nos laboratórios, há uma profusão de testes clínicos usando a manipulação genética a nosso favor. Os genes implantados têm propósitos diferentes. Entre outras funções, podem direcionar as células a destruir um tumor, corrigir uma mutação, determinar a fabricação de proteínas ou aumentar a capacidade de funcionamento do sistema imunológico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há alguns anos, falar em terapia gênica significava adentrar em um terreno de pura experimentação da medicina, algo que beneficiaria apenas gerações futuras, porém, esse futuro deixa de ser remoto e já são colhidos os primeiros frutos das pesquisas, sinalizando que os pesquisadores já estão capacitados e já podem avançar na terapia gênica.

Apesar do sucesso desses recursos, algumas ponderações são necessárias. Hoje, permanece a existência de limites técnicos para a produção em larga escalados dos vetores. Isso ainda encarece substancialmente o tratamento. Também ainda se buscam formas de assegurar que os genes inseridos funcionem adequadamente e não induzam à formação de problemas futuros. Porém, a contar pelos desafios já enfrentados pela terapia, é de esperar que os obstáculos fiquem cada vez mais para trás.

No ambiente escolar, se faz necessário abordar esses novos conceitos da área biotecnológica genética. A educação em genética humana deve promover nos alunos o desenvolvimento das habilidades de tomar decisões, reconhecer alternativas, aplicar informações e selecionar opções relativas à saúde em nível comunitário e pessoal; os estudantes devem ser preparados para utilizar os conceitos da área para entender e opinar em relação a aspectos sociais e éticos desse campo de conhecimento.

A apropriação desse conhecimento poderá dar-se com aula explicativa sobre terapia gênica seguida de seminários distribuídos entre os alunos, que abordarão as diversas temáticas, dos vetores utilizados as doenças candidatas aos benefícios.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, F. *The best of times, the worst of times*. **Science**, 288: 629-679, 2000.
- ANDREWS, J. L., KADAN, M. J., GORZIGLIA, M. I. et al. *Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII*. **Mol. Ther.**, março, 2001; 3 (3), 329–336.
- BAINBRIDGE, J.W et al. *Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis*. **N Engl J Med.**, maio, 2008; 358(21):2231-9.
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007.
- BERETA, G. et al. *Impact of retinal disease-associated RPE65 mutations on retinoid isomerization*. **Biochemistry**, v.47, n.37, p.9856-65, 2008.
- BERTRAND J.R. et al Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun** 296(4):1000-4, 2002.
- BING WANG, J. Z., SHAOHUI CUI, BAOLING YANG; et al. *Cationic liposomes as carriers for gene delivery: Physico-chemical characterization and mechanism of cell transfection*. **African Journal of Biotechnology**, fevereiro, 2012. V. 11, n. 11, p. 2763-2773.
- BROWN, Terence. A. **Gene cloning & DNA analysis: an introduction**. Editora Wiley-Blackwell, 6ª edição, 2010.
- CASTIELLO, M.C. et al. *B-cell reconstitution after lentiviral vector-mediated gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome*. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, Março, 2015.
- CAVAZZANA-CALVO, M. et al. *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. **Science**, abril, 2000. 288, 669–672.
- CAVAZZANA-CALVO, M.; FISCHER, A. *Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet?* **J Clin Invest**. junho, 2007; 117(6): 1456-65.
- CAVAZZANA-CALVO, M; FISCHER A HACEIN-BEY-ABINA, S, et al. Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 1. **Curr Opin Immunol**; 24(5):580-4, 2012.
- CHECK, E. *Gene therapy: a tragic setback*. **Nature** 420, 116–118, 2002.
- CHECK, E. *Cancer risk prompts US to curb gene therapy*. **Nature** 422, 7, 2003.
- CHEVRE, R. et al. *Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport*. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 4, p. 1610-22, Mar 2011.

COSTA D.; VALENTE, A.J.; MIGUEL, M.G.; QUEIROZ, J. *Plasmid DNA hydrogels for biomedical applications*. **Adv Colloid Interface Sci**, 205:257–264, 2014.

COUTO, L.B.; PIERCE, G.F. *AAV-mediated gene therapy for hemophilia*. **Curr Opin Mol Ther** 5:517–523, 2003.

DANI, S.U. *Terapia Gênica*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento – Saúde**. ano II, número 12. janeiro/fevereiro de 2000.

FISCHER, A.; CAVAZZANA-CALVO, M. *Gene therapy of inherited diseases*. **Lancet**. 14;371(9629):2044-7, Jun, 2008.

FLOTTE, T. R. *Gene therapy the first two decades and the current state-of-the-art*. **J. Cell Physiol.**, v.213, n.2, p301-5, 2007

FRANÇA, N.R. et al. *Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas*. **Revista Brasileira de Reumatologia** 50(6):695-709, 2010.

GANCSBERG, D.; DRAGLIA-AKLI, R. *Gene and Cell Therapy Funding Opportunities in Horizon 2020: An Overview for 2014–2015*. **HUMAN GENE THERAPY**, março, 2014. 25:175–177. ©European Union.

Genetics Home Reference. *Handbook Gene Therapy*. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/therapy.pdf>. Publicado em 22 de junho, 2015.

GINN, S. L. et al. *Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update*. **J Gene Med.**, fevereiro, 2013. v. 15, n.2, p. 65-77.

GONZALES, I.G.; CARVALHO, B.T.C. *Síndrome de Wiskott-Aldrich*. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** – Vol. 34. Nº 2, 2011.

HACEIN-BEY-ABINA, S.; PAI, SY, GASPARG, H.B., et al. *A modified γ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency*. **N Engl J Med.**, outubro, 2014;371(15):1407-17.

HASBROUCK, N. C.; HIGH, K. A. *AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: problems and prospects*. **Gene Ther.**, 2008. v.15, n.11, p.870-5.

HIGH, K.H.; NATHWANI, A.; SPENCER, T.; LILLICRAP, D. *Current status of haemophilia gene therapy*. **Haemophilia**. Volume 20 (Suppl. s4), 43-49, maio, 2014.

HOEPERS, Andréa T. C. *Hemofilia no estado de Santa Catarina – estudo clínico*. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol.30 nº2. São José do Rio, Preto Mar./Apr. 2008.

HOLLANDER, A. I. den et al. *FP Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms*. **Prog. Retin Eye Res.**, v.27, n.4, p.391-419, 2008.

IMMONEN, A. et al. *AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study*. **Mol. Ther.** 2004 Nov;10(5):967-72.

KOLOKOLTSOV, A.A.; WEAVER, S.C.; DAVEY, R.A. *Efficient functional pseudotyping of oncoretroviral and lentiviral vectors by Venezuelan equine virus envelope proteins.* **J Virol.**, janeiro, 2005. 79(2): 756-63.

LE MEUER, G.; et al. *Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium.* **Gene Ther.** 14(4):292-303, 2007.

LINDEN, R. Genes contra doenças. **Terapia gênica: uma nova era na genética.** Rio de Janeiro: Vieira e Lent, 2008. 128p.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que não será. **Estudos Avançados** 24 (70), 2010.

LINDEN, R.M.; BERNS, K.I. *Molecular biology of adeno-associated viruses.* *Contrib Microbiol* 4:68–84, 2000.

MA, B. et al. *Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery.* **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 3, p. 184-194, Nov. 2007.

MAGUIRE, A. M. et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. **N. Engl. J. Med.**, v.358, n.21, p.2240-8, 2008.

MENCK, C.F.M. A grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica. **Estudos Avançados** vol.24 no.70 p.99-108. São Paulo, 2010.

MENCK, C.F.M.; VENTURA, A.M. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP.** São Paulo, n75, p. 50-61. Setembro/novembro, 2007.

MINGOZZI, F.; HIGH, K. A. Immune responses to AAV in clinical trials. **Curr. Gene Ther.**, v.7, n.5, p.316-24, 2007.

MITNE-NETO, M.; ZATS, M. Terapia Gênica: Futuro tratamento para a Esclerose Lateral Amiotrófica? **Revista de Neurociência** V.14, nº2 (supl-versão eletrônica) abril/junho, 2006.

MUKHERJEE, S.; THRASHER, A.J. *Gene therapy for PIDs: Progress, pitfalls and prospects.* **Gene**, 525:174-81, 2013.

NARDI, N.B.; VENTURA, A.M. Terapia Gênica. **Mir L (org) Genômica.** São Paulo: Atheneu, 2004, cap. 30.

NARDI, N.B.; TEIXIERA, L.A.K.; SILVA, E.F.A. Terapia gênica. **Ciências & Saúde Coletiva**, 7(1): 109-116, 2002.

NARFSTRÖM, K. et al. *In vivo gene therapy in young and adult RPE65-/- dogs produces long-term visual improvement.* **J Hered.** 2003:94(1): 317.

National Institutes of Health (NIH). Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory

Committee. Hum. Gene Ther. 13, 3–13, 2002. *The official report into adenovirus vector toxicity, which was prompted by the death of Jesse Gelsinger in 1999.*

NOTARANGELO, L.D.; MIAO, C.; OCHS, H.,D. *Wiskott-Aldrich syndrome. Curr Opin Hematol* 2008;15:30-6.

NOVO L.; MASTROBATTISTA E.; VAN NOSTRUM, C.F.; LAMMERS T.; HENNINK, W.E. Decationized polyplexes for gene delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, 12:507–512, 2015

OLIVEIRA, Monique. A revolução da terapia genética. **Istoé - Medicina & Bem Estar**, edição 2254; janeiro, 2013. Disponível: http://www.istoec.com.br/reportagens/270736_A+REVOLUCAO+DA+TERAPIA+GENETICA

PARK, Y.M.; WOO, S.; LEE, G.T. et al. Safety and efficacy of adeno-associated viral vector-mediated insulin gene transfer via portal vein to the livers of streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. **J Gene Med.** Janeiro, 2013.

PENQUE, D. Terapia Génica: um Objectivo ou uma Realidade? *Biotechnology Molecular: Avanços e Aplicações. Boletim de Biotecnologia*, 66: 16-19, 2000.

SALAZAR-MONTES, A.M. ET AL. *New gene therapy strategies for hepatic fibrosis. WORLD J GASTROENTEROL.* ABRIL, 2015; 21(13): 3813–3825.

SANTOS, J.L.S. **Functionalization of dendrimers for improved gene delivery to mesenchymal stem cells.** Ph.D. Thesis. Funchal: Universidade da Madeira, 2009.

TEMPLETON, NANCY SMITH. *Optimization of Nonviral Gene Therapeutics. Gene and Cell Therapy, Therapeutic Mechanisms and Strategies.* USA: Editorial Marcel Dekker Inc. 2th Edition, 2004.

TENÓRIO, L.Z.; SILVA, F.H.; HAN, S.W. A Potencialidade dos Lentivírus na Terapia Gênica. **Rev Bras Clin Med**, 2008;6:260-267.

THOMAS, C.E.; EHRHARDT, A.; KAY, M.A. *Progress and Problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nature Reviews – Genetic.* Volume 4, p.346-58, maio/2003.

VASQUEZ, E.C.; MEYRELLES, S.S. Manipulação da expressão gênica para o entendimento e tratamento de doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Hipertensão**, vol. 8(1): 96-104, 2001.

WATSON, J. D. et al. *Recombinant DNA: genes and genomics: a short course.* S. l.: **Freeman**, 2006. 474p.

WORGALL, Stefan. A realistic chance for gene therapy in the near future. *Pediatr Nephrol* 20: 118–124, 2005.